Aus der Abteilung für Urologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

Untersuchungen zur klinischen Anwendbarkeit einer intraoperativen Lymphknotenvitalfärbung mit Hilfe von Guajazulen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Paul Michael Bausch
aus Cochem

1985

Aus der Abteilung für Urologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K.-H. Bichler
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen

Untersuchungen zur klinischen Anwendbarkeit einer intraoperativen Lymphknotenvitalfärbung mit Hilfe von Guajazulen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Paul Michael Bausch
aus Cochem

1985

Dekan:	Prof. Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Harzmann
2. Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. H.-V. Gärtner

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Allgemeine Vorbemerkungen	1
1.2.	Verfahren zur intraoperativen Lymphknoten-Identifizierung	4
1.3.	Forderungen an Farbstoffe für die Chromolymphographie	7
1.4.	Voruntersuchungen zur klinisch anwendbaren Lymphknotenvitalfärbung	9
1.5.	Voruntersuchungen zur Anwendbarkeit von Guajazulen für die Chromolymphographie	13
1.6.	Fragestellung	22
2.	METHODIK UND PATIENTEN	24
2.1.	Zubereitung der Guajazulen-Lipiodol-Lösung	24
2.2.	Experimentelle Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen	26
2.3.	Technik der klinisch angewandten Chromolymphographie mit Hilfe von Guajazulen-Lipiodol	27
2.4.	Klinische Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen	28
2.5.	Klinische Kontrollen nach Guajazulen-Lipiodol-Chromolymphographie	29
3.	ERGEBNISSE	31
3.1.	Zubereitung der Guajazulen-Lipiodol-Lösung	31
3.2.	Experimentelle Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen	32
3.3.	Erfahrungen mit der technischen Durchführung der Chromolymphographie	34
3.4.	Klinische Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen	35
3.5.	Ergebnisse der klinischen Kontrollen nach Chromolymphographie mit Guajazulen-Lipiodol	39

Seite

4. DISKUSSION 47

4.1. Herstellung der gebrauchsfertigen Farbstoff-Lösung 47

4.2. Experimentelle Daten zur Guajazulen-Resorption 48

4.3. Technische Details der Chromolymphographie-Anwendung 49

4.4. Klinische Daten zur Guajazulen-Resorption 50

4.5. Klinische Erfahrungen mit der Guajazulen-Chromolymphographie 51

4.6. Verbesserungsmöglichkeiten 56

5. ZUSAMMENFASSUNG 58

6. LITERATURVERZEICHNIS 60

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Die Lymphadenektomie - im folgenden als LA bezeichnet -, die als Präventiv-Maßnahme, als diagnostisches oder auch als kuratives Konzept bei verschiedenen lymphatisch metastasierenden Organmalignomen angewandt wird, hat einen positiven Einfluß auf die Überlebenschancen der so behandelten Patienten (9,10,13,14,16, 22,33). Dies gilt generell für Karzinome des Gastrointestinaltraktes, der Mamma, der Schilddrüse, des HNO-Bereiches, des Bronchialsystems, bei Hauttumoren und auch bei Karzinomen des inneren und äußeren weiblichen Genitale. Für den Bereich der Urologie sind hier neben dem Hoden-Karzinom das hypernephroide Karzinom sowie urotheliale Tumoren der ableitenden Harnwege inclusive der Harnblase zu nennen. Unbestritten ist, daß die seit 1945 etablierte retroperitoneale LA beim embryonalen und beim Teratokarzinom des Hodens die Fünfjahres-Überlebensraten um mehr als 30 % verbessert (10, 13 14,33). Kontrovers wird demgegenüber der Stellenwert dieses Therapieverfahrens beim Seminom und beim Chorionepitheliom des Hodens beurteilt.

Bis etwa 1980 wurde die transperitoneale LA in Form eines radikalen Eingriffs durchgeführt, bei dem alle paraaortalen, intraaortico-cavalen und paracavalen Lymphknoten unabhängig von Lokalisation und T-Kategorie des primären Hodentumors reseziert werden. Naturgemäß waren wichtigstes Zielgebiet der Resektion die Lymphknotengruppen in Höhe von LWK 1 bis LWK 4, da hier das primäre lymphatische

Drainagegebiet des Hodens liegt (9). Grundlagenuntersuchungen von Chiappa, S. et al. (3) und Ray, B. et al. (25), die die spezifischen Drainagewege des linken und des rechten Hodens bzw. den Metastasierungsweg beim Hodenkarzinom dargestellt haben, führten zur Empfehlung, eine modifizierte Lymphadenektomie mit unterschiedlicher Resektionsbegrenzung bei rechtsseitigen und linksseitigen Tumoren durchzuführen (33). Wichtigster Anlaß, von der radikalen beiderseitigen LA abzukommen, war die nach diesem Eingriff in mehr als 70 % der Fälle nachweisbare Ejakulationsstörung bei den so behandelten Patienten (22,24,36). Entsprechende Untersuchungen führten zu der Feststellung daß diese Folgeerscheinungen des operativen Eingriffs ihre Ursache haben in Verletzungen des autonomen Nervensystems der Retroperitonealregion. Konsequenz davon ist eine Innervationsstörung entweder von Nebenhoden, Samenleiter und Samenblase (Samentransportstörung) oder des Harnblasenhalses, der zum Zeitpunkt der Ejakulation nicht - wie dies normalerweise der Fall ist - verschlossen wird, sondern hypoaktiv bleibt, so daß eine retrograde Ejakulation resultiert (22, 24).

Wesentlicher Nachteil der retroperitonealen LA bei Hodenkarzinomen ist somit die ungenügende Selektivität des Eingriffs, die darauf beruht, daß die Strukturen des lymphatischen Systems intraoperativ nicht zweifelsfrei von denen des autonomen Nervensystems abgegrenzt werden können. Unbeabsichtigte und vor allem auch hinsichtlich der Fertilität unerwünschte Verletzungen dieser Nervenstrukturen sind die Folge.

Neben der mangelhaften Selektivität ist auch auf die mangelhafte Radikalität der LA hinzuweisen. Auch bei subtiler Technik - gleichbedeutend einem sehr zeitaufwendigen und den Patienten belastenden Eingriff - bleiben bis zu 30 % der Lymphknoten in situ (32). Daraus folgt, daß durch die übliche radikale LA eine komplette Resektion aller Lymphknoten mit eventueller mikroskopisch nachweisbarer Metastasierung nicht gewährleistet werden kann.

1.2. Verfahren zur intraoperativen Lymphknoten-Identifizierung

Um eine gleichzeitig komplette und dennoch hinsichtlich der Fertilität nebenwirkungsfreie Resektion erzielen zu können, wurden bereits mehrfach Versuche unternommen, das lymphatische System intraoperativ gegenüber dem umgebenden Fett- und Nervengewebe abgrenzbar zu machen. Geeignet erscheint die von W. Kuber und S. Leodolter (16) beschriebene indirekte radioisotopenkontrollierte LA. Hierbei erfolgt eine Lymphknotenmarkierung mit Hilfe geeigneter Isotope, die dann mittels nuklearmedizinischer Techniken intraoperativ im Retroperitonealraum verfolgt werden können. Entscheidender Nachteil dieses Verfahrens ist der hohe materielle bzw. technische Aufwand (nuklearmedizinische Detektoranlage im OP). Weiterhin besteht wegen mangelhafter Auflösung der Bildstrukturen eine ungenügende Detaildarstellung der lymphatischen Strukturen. Hinzu kommt die Notwendigkeit, die Vollständigkeit der Resektion über den Bildschirm, d.h. indirekt zu kontrollieren. Aus Lymphgefäßen bzw. Lymphknoten während der Resektion austretende Isotope können darüber hinaus die Kontrolle der Resektion zusätzlich erschweren. Demgegenüber bietet eine Farbstoffanreicherung im Lymphknoten die Möglichkeit, die lymphatischen Strukturen intraoperativ direkt zu erkennen. Somit gelingt es, die Strukturen des lymphatischen Systems gegenüber Nachbargeweben wie Fett, Gefäßen und vor allem Nerven, abzugrenzen. Dieses vom Konzept her wesentlich einfachere und gleichzeitig sicherere Verfahren wurde dementsprechend bereits mehrfach experimentell und auch klinisch zu verifizieren versucht (4,5,6,7,15,17,18,19,20,21, 23,26,27,28,29,30,31,34). Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der

1)	Kohlenstoff	Ludvik, W., 1965 (17,18)
2)	Chlorophyll	Gregl, A. et al., 1968 (7)
3)	Xanthophyll	Ludvik, W. et al., 1968 (17,18)
4)	Blauschwarz-B	Spelsberg, S. et al., 1968 (29)
5)	Chromgrün	Spelsberg, S. et al., 1968 (29)
6)	Thioflavion-S	Spelsberg, S. et al., 1968 (29)
7)	Tusche	Spelsberg, S. et al., 1968 (29)
8)	Na-Fluorescein	Schmidt-Mende, M. et al., 1968 (31)
9)	Primulingelb	Schmidt-Mende, M. et al., 1968 (31)
10)	Acridinorange	Schmidt-Mende, M. et al., 1968 (31)
11)	Chlorophyll	Zerbino, D. et al., 1975 (34)
12)	Chromolymphotrast	Remizow, A.L. et al., 1978 (26,27)

Tab. 1: Zusammenstellung der wichtigsten bisherigen Publikationen zur Chromolymphographie.

wichtigsten bisher untersuchten Farbstoffe bzw. Substanzen. Generell ist festzustellen, daß alle hier aufgeführten Verbindungen weder experimentell noch klinisch überzeugen konnten. Bisher existiert kein für die klinische Anwendung geeigneter Farbstoff.

1.3. Forderungen an Farbstoffe für die Chromolymphographie

An einen für die intraoperative Lymphknotenvitalfärbung eingesetzten Farbstoff müssen vor seiner Verwendung in der Klinik die in Tabelle 2 dargestellten Forderungen gestellt werden. Selbstverständlich sind neben einem deutlichen Kontrast die Sterilisierbarkeit der Substanz und ihre physiologische wie toxikologische Unbedenklichkeit. Weiterhin sollten karzinogene Wirksamkeit und bleibende Verfärbung der Haut vor jeder klinischen Anwendung absolut sicher ausgeschlossen worden sein. Demgegenüber wäre eine fehlende Fettlöslichkeit der Substanz kein ausschlaggebender Grund, sie klinisch nicht zu verwenden. Die Fettlöslichkeit eines Farbstoffes hat jedoch den Vorteil, daß dieser zusammen mit dem handelsüblichen Kontrastmittel für die reguläre Lymphographie - Lipiodol[R1] - kombiniert eingesetzt werden kann und damit nicht nur die intraoperative, sondern auch eine normale röntgenologische Kontrolle erlaubt. In gleicher Weise hat die Forderung, daß der Farbstoff die normale lymphographische Diagnostik nicht beeinträchtigen sollte, nur eine untergeordnete Bedeutung.

Der deutlichste Farbkontrast ist grundsätzlich von blauen und schwarzen Farbstoffen zu erwarten, während intraoperativ ein grüner (Chlorophyll, Chromolymphotrast[2]) oder roter (Xanthophyll) Kontrast nur wenig hilfreich erscheint.

[1] Byk-Gulden, Konstanz

[2] 1-Aminobenzoylanthrachinon und 1,4-Di-toluidino-anthrachinon

Intensiver Kontrast

Physiologische Unbedenklichkeit

Toxikologische und onkologische Unbedenklichkeit

Keine permanente Hautverfärbung

Sterilisierbarkeit

Fettlöslichkeit

Keine Beeinträchtigung der lymphographischen Aussage

Tab. 2: *Forderungen an Farbstoffe, die für die intraoperative Lymphknotenvitalfärbung klinisch eingesetzt werden sollen.*

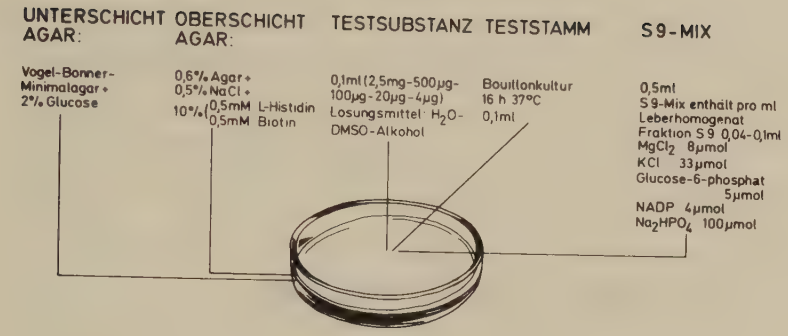
1.4. Voruntersuchungen zur klinisch anwendbaren Lymphknoten-vitalfärbung

Blaue und schwarze Farbstoffe stehen für die experimentelle Anwendung in ausreichender Zahl zur Verfügung. Tabelle 3 nennt die von R. Harzmann et al. (9,10,13) bisher untersuchten Substanzen. Von diesen wurden aus den oben genannten Gründen primär nur die fettlöslichen berücksichtigt. Vor jeder weiteren Prüfung wurde jeder einzelne Farbstoff für sich und nach intraperitonealer Verabreichung bei Ratten auch bezüglich seiner Metaboliten auf mutagene bzw. karzinogene Wirkungen untersucht. Verwandt wurde dabei der bakterielle Mutagenesetest nach Ames (2). Dieser Test basiert auf der Tatsache, daß speziell manipulierte Stämme von Salmonella typhimurium bei Anwesenheit einer mutagenen bzw. karzinogenen Substanz revertieren. Während die Mutanten-Stämme in histidinfreien Nährböden nicht wachsen, bilden die Revertanten (Wildformen von Salmonella typhimurium) auf diesen Böden Kolonien, die somit die Anwesenheit eines Mutagens bzw. Karzinogens signalisieren (2,11,12) (Tab. 4). Sudan-Schwarz, Oracet-Blau und Öl-Blau verhielten sich im Ames-Test positiv, während Guajazulen keine Revertantenbildung induzierte. Diese Ergebnisse wurden nach subcutaner Injektion der genannten Substanzen an Hand von Urinproben der so behandelten Ratten (n=10/Substanz) erhalten. Weiterhin wurde jeder Farbstoff im Ames-Test auch direkt geprüft. Beide Untersuchungsreihen erfolgten mit Hilfe von 4 verschiedenen Teststämmen (TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537). Zur Simulierung der Leberpassage wurde darüber hinaus dem Testsystem S9-Mix in einer gesonderten

wasserlöslich		*fettlöslich*	
Brilliant Schwarz	*= Food Black 1*	*Sudanschwarz-B*	*= Solvent Black 3*
Eriochromschwarz T	*= Mordant Black 11*	*Oracetblau B*	*= Solvent Blue 19*
Nilblausulphat	*= Basic Blue 12*	*Oil Blue N*	*= Solvent Blue 14*
Oil Blue A	*= Solvent Blue 36*	*Guajazulen*	*= 1,4-Dimethyl-7-Isopropylazulen*
Alcianblau 8GX	*= Ingrain Blue 1*		
Coomassie Brilliant Blau G250	*= Acid Blue 90*		
Coomassie Violett R 105	*= Acid Violett 17*		

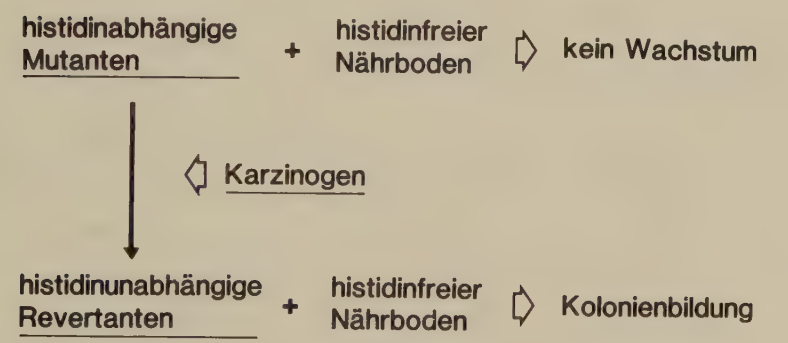
Tab. 3: *Für die intraoperative Lymphknotenvitalfärbung untersuchte schwarze und blaue Farbstoffe (10).*

a)



b)

c)



Tab. 4: Prinzip des bakteriellen Mutagenesetests nach Ames (2).

a und b: Schematische Testdarstellung, c: Testprinzip.

Testreihe hinzugefügt. Dabei handelt es sich um eine Lebermikrosomenpräparation, die aus Rattenlebern nach Induktion mit Arochlor hergestellt wurde und im Laborversuch den in der Leber normalerweise erfolgenden Metabolismus der Farbstoffe nachahmt. Da Guajazulen im Ames-Test negativ war, wurden weitere Untersuchungen zur Chemie dieser Substanz (1), ihrer Löslichkeit in Fett bzw. Lipiodol^{R} und zur Anwendbarkeit im Tierversuch durchgeführt.

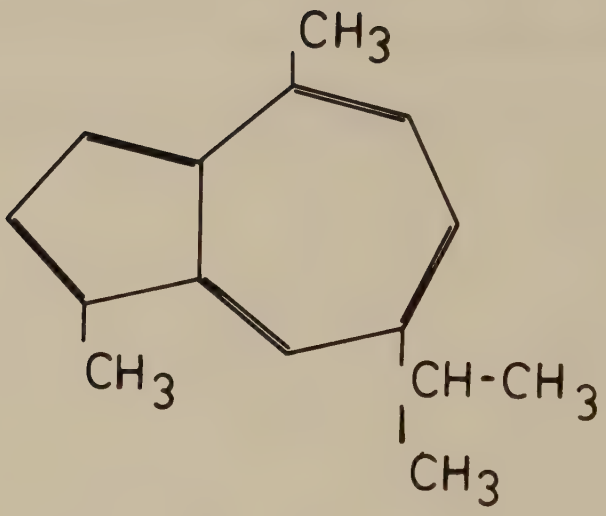
1.5. Voruntersuchungen zur Anwendbarkeit von Guajazulen für die Chromolymphographie

Bei der Substanz Guajazulen[1] handelt es sich um einen im Handel zu beziehenden Farbstoff, der aus 1,4-Dimethyl-7-Isopropylazulen besteht.
Tabelle 5 zeigt die Strukturformel der Substanz, die dem Wirkstoff der Kamille verwandt ist. Für die weiße Maus ist die LD 50 von Guajazulen bekannt, sie beträgt 800 mg/kg.

Voruntersuchungen zur Frage der Sterilisierbarkeit verschiedener Farbstoff-Lipiodol^{R}-Mischungsverhältnisse ergaben, daß Hitzesterilisierungen eine Veränderung des Moleküls zur Folge haben. Demgegenüber erschien die Ultrafiltration mit Filterporengrößen von 0,20 µ für die Sterilisierung der Lösung geeignet.
Die genannten Vorinformationen führten zur experimentellen Anwendung von unterschiedlichen Guajazulen-Lipiodol-Konzentrationen im Tierversuch. 11 Bastardhunde und 4 Zwergschweine wurden jeweils an einer der beiden unteren Extremitäten in typischer Weise lymphographiert. Dabei erfolgte nach der üblichen interdigitalen Patentblauinjektion die operative Freilegung eines dadurch angefärbten Lymphgefäßes. Im Anschluß daran wurden jeweils 5 ml einer 1, 5, 10 oder 20 %igen Guajazulen-Lipiodol-Lösung über einen Zeitraum von 30 Min. mit Hilfe eines Perfusors[2] infundiert.

[1] Merck AG, Darmstadt

[2] Braun-Melsungen, Melsungen

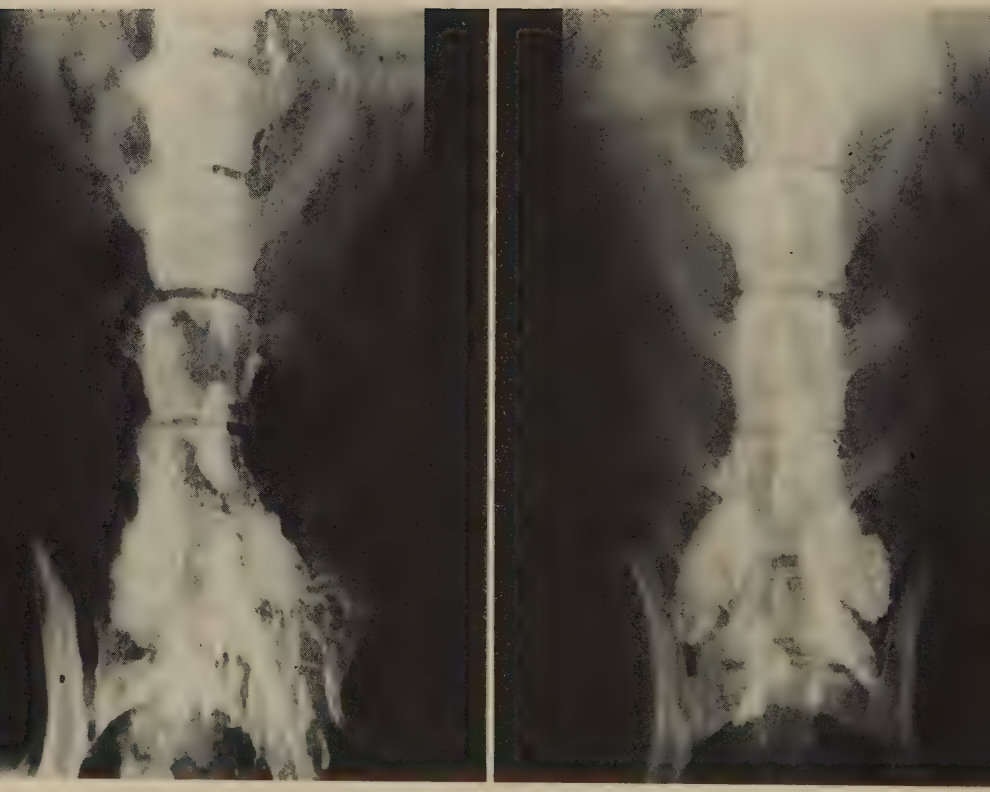


Tab. 5: *Strukturformel von 1,4-Dimethyl-7-Isopropylazulen (Guajazulen),*

Röntgenkontrollen erfolgten unmittelbar nach der Lymphographie (Füllungsphase), 24 Std. (Speicherphase) und 7 Tage nach der Applikation des Farbstoffes. Die operativen Kontrollen erfolgten direkt nach Farbstoffinfusion, am 2., 7. oder 14. Tag nach dem Eingriff. Dabei wurden popliteale bzw. paraaortale Lymphknoten entfernt. Die Aufarbeitung für die histologische Beurteilung erfolgte nach Formalinfixation mit Hilfe der HE-, Giemsa- und Eisenfärbung[1] . Da sich zeigte, daß die Formalinfixation ebenso wie die herkömmliche Färbetechnik zu einer partiellen Auslösung des Guajazulen-Lipiodol-Komplexes aus den Sinus führt, wurden einzelne Präparate auch im Nativschnitt mittels Gefrierschnitt-Technik beurteilt. Weiterhin erfolgten nach 21 Tagen Versuchsdauer die Tötung der Tiere und eine histologische Beurteilung der Lunge, des Leber-, Milz- und Herzgewebes.

Ausgehend von den tierexperimentellen Ergebnissen ist festzustellen, daß die Verträglichkeit der Substanz der des Lipiodols entsprach. Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt. Die Röntgenkontrollen ergaben, daß die Kontrastierung der Lymphknoten nach Guajazulen-Lipiodol-Chromolymphographie der der normalen Lymphographie entsprach. Eine wesentliche Kontrastmittelabflußbehinderung und damit eine Beeinträchtigung der lymphographischen Aussage durch die verwandten Farbstoffkombinationen wurde nicht festgestellt (Abb. 1).
Die intraoperative Kontrolle zeigte einen tiefblauen Kontrast in den Lymphknoten, die an die mittels Chromolymphographie kontrastierten Lymphgefäße angeschlossen waren. Dies führte zu einer deutlichen Kontrastierung der Lymphknoten gegenüber dem benachbarten Gewebe

[1] Die histologischen Arbeiten erfolgten ebenso wie die Beurteilung der Schnitte im Institut für Pathologie der Universität Tübingen



a b

Abb. 1: Röntgenologischer Befund nach Guajazulen-Lipiodol-Lymphographie. a: Füllungsphase, b: Speicherphase. Tierexperimentelle Befunde nach Guajazulen-Lipiodol-Lymphographie beim Hund.

und auch gegenüber Lymphknoten, die mittels der herkömmlichen Lymphographie nicht kontrastiert werden konnten (Abb. 2).
Der makroskopische Vergleich von Lymphknoten nach normaler Lymphographie mit solchen nach Chromolymphographie ergab den in Abb. 3 dargestellten Befund. Die histologische Untersuchung ließ Kontrastmittelreste in den Sinus der Lymphknoten erkennen. Diese Kontrastmittelreste waren in Büschelform angeordnet, was durch die partielle Farbstoffauslösung durch Formalinfixation und herkömmliche histologische Färbung verursacht wurde (Abb. 4).
Demgegenüber zeigte der Gefrierschnitt eine homogene Durchsetzung des Präparates mit dem Guajazulen-Lipiodol-Gemisch, das den Lymphknoten trotz fehlender histologischer Färbung tiefblau kontrastierte (Abb. 5).
Pathologische Veränderungen, die über die nach normaler Lymphographie hinausgingen, wurden bei der histologischen Beurteilung von Lungen-, Leber-, Milz- und Herzgewebeproben nicht festgestellt.

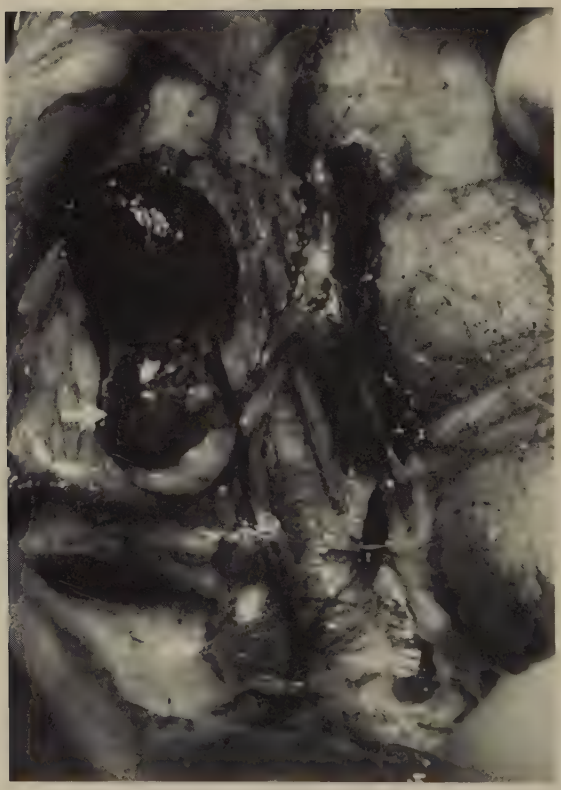


Abb. 2: *Intraoperativer Befund unmittelbar nach Chromolymphographie mit Hilfe von Guajazulen-Lipiodol: Die an kontrastmittelgefüllte Lymphgefäße angeschlossenen Lymphknoten zeigen einen deutlichen Kontrast zum umgebenden Gewebe, während nicht im Drainagegebiet liegende Knoten (Pfeile) ungefärbt bleiben.*

Abb. 3: *Makroskopischer Befund von 2 selektiv entfernten Lymphknoten. Links ein Lymphknoten nach herkömmlicher Lymphographie, rechts ein Lymphknoten nach Chromolymphographie mit Guajazulen-Lipiodol.*

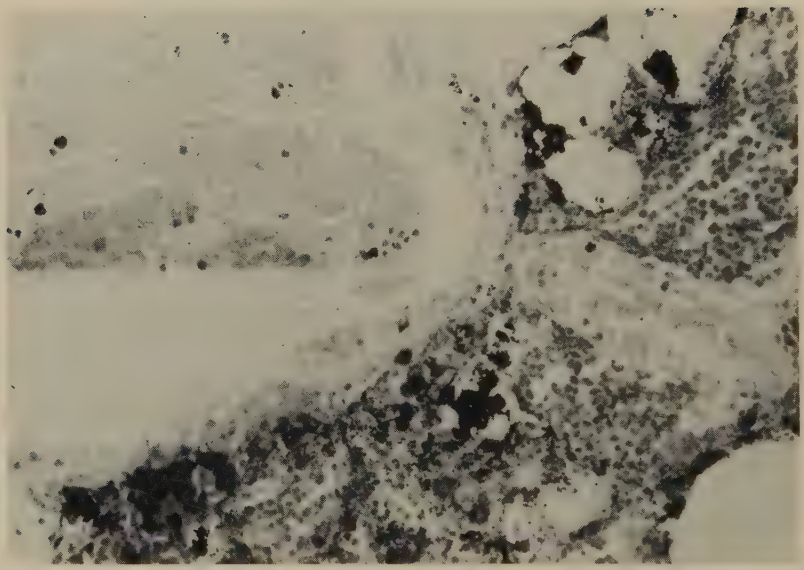


Abb. 4: Mikroskopischer Befund nach Guajazulen-Lipiodol-Lymphographie und HE-Färbung. Durch den Fixations- und Färbevorgang sind Teile des Kontrastmittels aus den Sinus herausgelöst. Reste davon sind in Büschelform dargestellt.

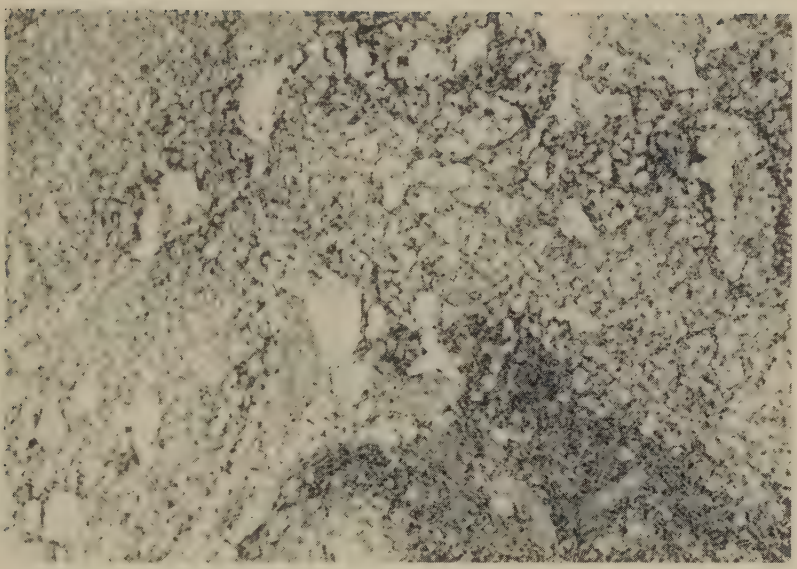


Abb. 5: Mikroskopischer Befund nach Guajazulen-Lipiodol-Lymphographie ohne Formalin-Fixation und ohne herkömmliche Färbung. Situation bei Gefrierschnittechnik. Es findet sich eine homogene Durchsetzung des Lymphknotens durch die Farbstoff-Lösung.

1.6. Fragestellung

Die bisher vorliegenden Daten, die von Harzmann, R. et al. (10) bereits 1982 publiziert wurden, veranlaßten die Einführung dieses Verfahrens bei bestimmten Formen der urologisch-onkologischen Lymphadenektomie in die Klinik. Für die Chromolymphographie waren hier zunächst vorgesehen die klassischen Indikationen beim Karzinom des Hodens (Teratokarzinom, embryonales Karzinom, im Einzelfall auch Seminom) und beim Prostatakarzinom.

Bei letzterer Indikation sollte bei entsprechendem Befund die Chromolymphographie in den Fällen erfolgen, in denen anstelle der radikalen Prostatektomie bzw. der androgenen Entzugstherapie eine kurative Strahlentherapie geplant war. Hier war die Chromolymphographie als operationserleichternder Eingriff im Rahmen der Staging-Lymphadenektomie konzipiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen,

1. in welchem Zeitraum die injizierte Farbstoffsubstanz im Serum erscheint bzw. aus dem Serum wieder verschwindet,
2. ob Guajazulen mit dem Urin der Patienten ausgeschieden wird,
3. welche Guajazulen-Lipiodol-Konzentration für die Lymphknotenkontrastierung des Retroperitonealraumes geeignet ist,
4. welcher Abstand zwischen Chromolymphographie und Lymphadenektomie aus Gründen pulmonaler Diffusionsveränderungen nach Lymphographie und aus Gründen des optimalen Lymphknotenkontrastes zweckmäßig erscheint,

5. *welche klinischen Befunde nach Chromolymphographie verglichen mit den Erfahrungswerten von der herkömmlichen Lymphographie festzustellen sind,*
6. *ob über die normalen Veränderungen nach herkömmlicher Lymphographie hinausgehende histologische Befunde nach Chromolymphographie festgestellt werden.*

2. METHODIK UND PATIENTEN

2.1. Zubereitung der Guajazulen-Lipiodol-Lösung

Als Ausgangssubstanz dienten kristallines Guajazulen, Artikel-Nr. 425[1] und Lipiodol-Ultrafluid[R2] . Zur Herstellung von 10 %igen und 20 %igen Guajazulen-Lipiodol-Lösungen (Gewichtsprozente) wurden die Substanzen in den notwendigen Mengenverhältnissen in ein sterilisiertes Glas eingewogen. Anschließend erfolgten nach kurzer Stickstoffbegasung der Verschluß des Gefäßes und die Lösung der kristallinen Substanz mit Hilfe eines Magnetrührers[3] , mit dem die Lösung minimal 30 Min., maximal 60 Min. bearbeitet wurde. Anschließend erfolgte die Umfüllung der Lösung in ein Edelstahlfiltrationsgerät[4] , danach die Sterilfiltration mit ca. 4 bar Stickstoffdruck in 10 ml-Durchstechampullenfläschchen. Es folgten der Verschluß der Gefäße mit Silikonstopfen und deren Zubördelung. Nach der Etikettierung wurden die Proben gezogen. An vorbereitenden Arbeiten sind die Verpackung von Filtermaterial, Filterhalter, Glasgeräten und Silikonstopfen in Aluminiumfolien sowie die Sterilisierung bei 160° C über einen Zeitraum von 60 Min. im Trockenschrank zu nennen. Die genannten Arbeiten erfolgten aseptisch unter Laminarflow-Bedingungen. Die Filtrationsdauer betrug für eine 10 %ige Lösung jeweils 30 Min. pro 100 ml[5] . Es wurden

[1] Merck AG, Darmstadt

[2] Byk Gulden, Konstanz

[3] IKA, Staufen

[4] Sartorius, Göttingen

[5] Die Sterilfiltration erfolgte in der Universitätsapotheke Tübingen

Filter aus regenerierter Zellulose mit einem Durchmesser von 47 mm verwandt. Die Porenweite betrug 0,8 µ, 0,45 u bzw. 0,20 µ[1]. Vor Anwendung der so hergestellten Lösungen erfolgte jeweils eine subtile bakteriologische Kontrolle der Sterilität der Substanz[2]. Unter sterilen Kautelen (Steribank) wurden flüssige Nährböden mit Eignung für Bakterien- und Pilzwachstum beimpft. Anschließend folgte über einen Zeitraum von 14 Tagen eine Bebrütung bei 30° C mit nachfolgender Wachstumskontrolle.

[1] Sartorius, Göttingen

[2] Die Sterilitätskontrollen erfolgten im Hygiene-Institut der Universität Tübingen

2.2. Experimentelle Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen

10 weibliche SIV 50-Ratten[1] erhielten jeweils eine intraperitoneale Injektion von 0,4 ml Guajazulen-Lipiodol mit einem Guajazulen-Gehalt von 200 mg. Diesen Tieren wurden im Abstand von jeweils 1 Stunde je 0,5 ml Blut aus der Schwanzvene entnommen. Anschließend erfolgte die Extraktion mit Hilfe von 2 ml Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde durch Zentrifugieren mit 3000 U/min in einer Laufzeit von 10 Minuten abgetrennt. Sie wurde nachfolgend für die quantitative Bestimmung von Guajazulen verwandt. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers[2] wurden die Extrakte zunächst auf ca. 3 ml, dann mit N_2 auf 100 µl eingeengt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die Peakhöhe bei 285 nm wurde für die extrahierten Blutproben und authentische Proben von Guajazulen ermittelt. Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie[3] wurden bei typischer technischer Einrichtung Lichrosorb RP8-Säulen und als Detektor ein UV-Spektralphotometer[4] bei 285 nm verwandt. Als mobile Phase dienten Methanol und ein Gemisch aus 80 % MeOH + 20 % H_2O. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2 ml/min, der Säulendruck 50 Bar[5]. Die erhaltenen Peakhöhen (Retentionswert 1,8 Min.) wurden mit authentischen Proben von Guajazulen verglichen.

[1] Ivanovas, Kißlegg

[2] Büchi, Buchs, Schweiz

[3] Knauer, Modell 5200, Berlin

[4] Beckmann, Modell UV 5230, München

[5] Die Messungen erfolgten im Hygiene-Institut der Universität Tübingen

2.3. Technik der klinisch angewandten Chromolymphographie mit Hilfe von Guajazulen-Lipiodol

Die Chromolymphographie erfolgte bei 10 Patienten (8 Patienten mit Hodenkarzinom, 2 Patienten mit Prostatakarzinom) mit Hilfe einer 10%igen, bei weiteren 2 Hoden-Karzinom-Patienten mit Hilfe einer 20%igen Guajazulen-Lipiodol-Lösung. Nach interdigitaler Injektion von jeweils 1 ml Patentblau[R1] im 1. Interdigitalraum links und rechts erfolgte über einem dann sichtbaren Lymphgefäß links wie rechts eine Hautincision in Lokalanästhesie. Es wurde dann ein in typischer Weise links wie rechts freipräpariertes Lymphgefäß mit Hilfe eines 0,35 mm Punktionsbestecks[2] kanüliert. Die Fixation der Nadel im Gefäß erfolgte mit Hilfe eines Gewebeklebers (Histoacryl[R3]). Die Farbstoffinfusion erfolgte mit Hilfe eines Perfusors[4], wobei darauf geachtet wurde, daß die Infusion langsam, d.h. mindestens über einen Zeitraum von 30 Minuten erfolgte (Geräteinstellung 6). Nach beendeter Farbstoffapplikation wurden die Nadeln entfernt, das Lymphgefäß mit Hilfe des Gewebeklebers verschlossen und die Hautnaht durchgeführt. Die Dosierung von Guajazulen-Lipiodol erfolgte gewichtsbezogen, im Schnitt wurden pro untere Extremität 10 ml infundiert.

Röntgenkontrollen wurden unmittelbar nach Beendigung der Chromolymphographie (Füllungsphase) und nach Ablauf von 24 Stunden nach der Lymphographie (Speicherphase) durchgeführt[5].

[1] Byk Gulden, Konstanz

[2] Ulrich, Ulm

[3] Braun-Melsungen, Melsungen

[4] Braun-Melsungen, Melsungen

[5] Röntgen-Abteilung, Zentrum für Chirurgie der Universität Tübingen

2.4. Klinische Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen

Die Messung der Blut-Werte von Guajazulen erfolgte in regelmäßigen Abständen und zwar 2, 4, 6, 8, 16, 24 und 36 Stunden nach Beendigung der Lymphographie. Weiterhin wurden vor Beginn der Lymphographie zwei Nullwerte abgenommen. Entnommen wurden jeweils 8 ml Blut, denen je 2 ml Heparin zugefügt wurden.
Die so gewonnenen Proben wurden zunächst mit 10 ml Aqua dest. vermischt und anschließend 10 Minuten stehen gelassen. Es folgte die Extraktion über Glassäulen, die mit Extrelut 20[R1] [1] gefüllt worden waren. Im Anschluß daran wurde die Extraktion des fettlöslichen Farbstoffes mit Hilfe von 75 ml Essigsäureäthylester vorgenommen. Die Eluate wurden dann mit Hilfe des Rotationsverdampfers auf ca. 3 ml, anschließend mit Hilfe von N_2 auf exakt 0,5 ml eingeengt. Die Auftrennung der Proben erfolgte dann mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) [2] . Im Einzelnen wurden dabei folgende Materialien und Techniken verwandt: Als Säulen dienten Nucleosil RP 18, 10 µm mit einer Abmessung von 250 mm x 4,6 mm [3] . Als Laufmittel dienten 80% Methanol und 20% H_2O bidest. Der Durchfluß betrug 2 ml/min bei 140 bar, das Probenvolumen 20 µl, die Wellenlänge im Ultraviolettbereich 282 nm. Als Pumpen dienten Altex-Pumpen Modell 110 A [4] , als Detektor das Hitachi Spektrophotometer 100-10 [5] . Als Integrator wurde Altex Modell C-R 1 A verwandt [6] .
In gleicher Weise wurde mit Urinproben (jeweils 50 ml) verfahren, die zu den gleichen Zeiten entnommen wurden.

[1] Merck, Darmstadt
[2] Die Messungen erfolgten im Hygiene-Institut der Universität Tübingen
[3] Macherey Co. Nagel, Düren
[4] Beckmann, München
[5] Hitachi, München
[6] Beckmann, München

2.5. Klinische Kontrollen nach Guajazulen-Lipiodol-Chromolymphographie

Im Verlauf der Chromolymphographie und in der 48-Stunden-Phase danach wurden die so behandelten Patienten klinisch lückenlos überwacht. Dabei wurde auf Nebenwirkungen wie Schmerzsensationen während der Farbstoffinfusion, allergische Reaktionen, Hautverfärbungen und Urinverfärbung geachtet, daneben Puls und Blutdruck regelmäßig kontrolliert. Darüberhinaus erfolgten 24 und 48 Stunden nach Chromolymphographie Röntgenaufnahmen des Thorax, um pulmonale Diffusionsstörungen - verursacht durch Guajazulen-Lipiodol - frühzeitig erkennen zu können. Dem gleichen Zweck dienten arteriell entnommene Blutgasanalysen, die 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Chromolymphographie gewonnen wurden. Die Lymphadenektomie erfolgte ausgehend von den Befunden des Tierversuchs zunächst 4 oder 5 Tage nach der Farbstoffinfusion. Da sich herausstellte, daß die Lymphknotenkontrastierung zu diesem Zeitpunkt schon rückläufig ist, wurde der Operationstermin vorverlegt. Dies diente letztlich dem Ziel, als Voraussetzung für eine selektive und gleichzeitig komplette Lymphadenektomie einen optimalen Farbkontrast der Lymphknoten zu erreichen. Die zuletzt behandelten Patienten (n=6) wurden dementsprechend am der Chromolymphographie nachfolgenden Tag operiert. Die bei der Operation gewonnenen Befunde wurden photographisch, zum Teil auch im Film dokumentiert. Während der Operation wurde abgesehen von Selektivität und Radikalität besonderes Augenmerk darauf gelegt, ob ein während des Resektionsvorganges unbeabsichtigt verur-

sachter Farbstoffaustritt aus den Lymphknoten den Resektionsvorgang beeinträchtigt.

Die im Retroperitonealraum paraaortal, interaorticocaval und paracaval bzw. iliacal gelegenen Lymphknoten wurden anschließend für die histologische Bearbeitung vorbereitet. Dies erfolgte zum einen mit Hilfe einer Fixation in 10%igem gepuffertem Formalin. Zum anderen erfolgte die Gefrierfixation in flüssigem Stickstoff. In letzterem Fall wurde die histologische Beurteilung im Sinn der Gefrierschnitt-Technik vorgenommen. Die formalinfixierten Präparate wurden in typischer Weise geschnitten und mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. In einzelnen Fällen wurden darüber hinaus auch Eisenfärbungen und Gefrierschnitte durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen[1] . Zielsetzung der histologischen Untersuchung war es, neben der Metastasendiagnostik eine Aussage zu der Frage zu erhalten, ob die Guajazulen-Beimengung zum Lipiodol zu Veränderungen führt, die über die bekannten Befunde nach Lipiodol-Lymphographie hinausgehen. Da bekannt ist, daß die Lipiodol-Lymphographie im Einzelfall eine Erschwerung der Metastasen-Diagnostik zur Folge haben kann, wurde darauf geachtet, ob zusätzliche, durch Guajazulen induzierte Veränderungen zu beobachten sind und die Beurteilung weiter erschweren.

[1] Histologische Aufbereitung und Beurteilung erfolgten im Institut für Pathologie der Universität Tübingen

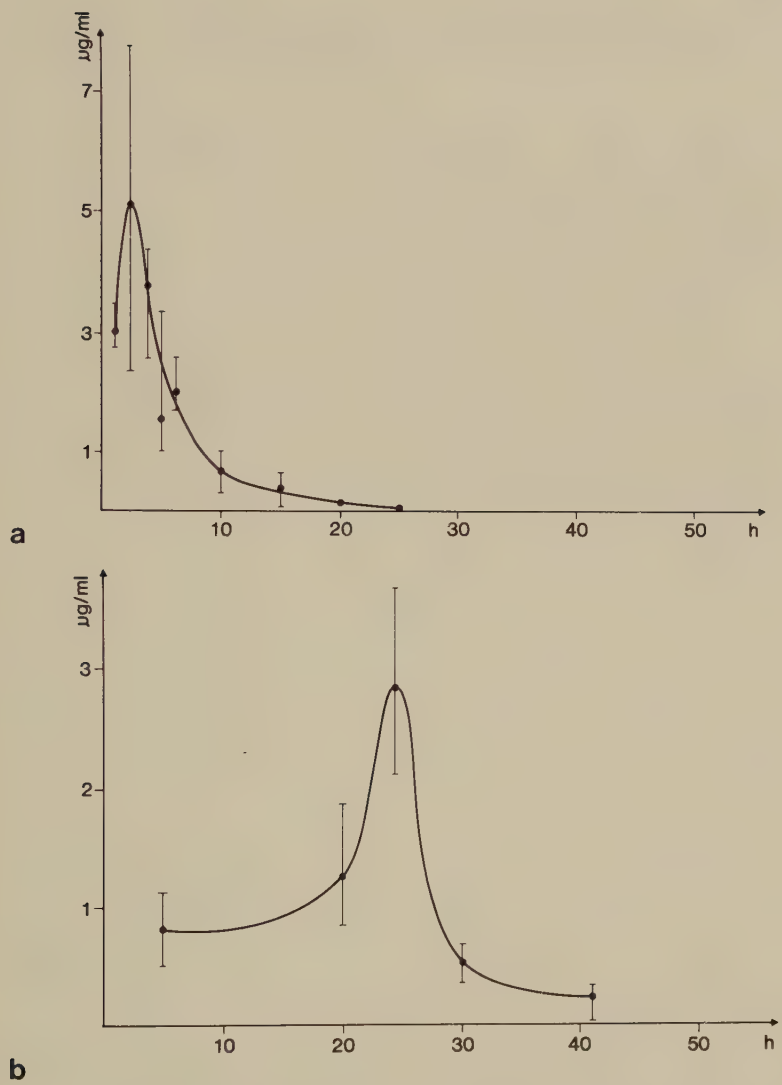
3. ERGEBNISSE

3.1. Zubereitung der Guajazulen-Lipiodol-Lösung

Die Kontrolle der Sterilität der Proben ergab für die 10%igen Lösungen jeweils Sterilität. Letztlich nicht nachzuvollziehende Aufbereitungsfehler führten bei der Herstellung der ersten 20%igen Lösungen zum Nachweis von Sporenbildnern. Weitere Proben waren in der nachfolgenden subtilen Sterilitätsdiagnostik nicht zu beanstanden. Insgesamt erwies sich das technische Vorgehen zur Herstellung einer sterilen Lösung als unproblematisch. Auf eine Sterilisierung mit Hilfe von Gamma-Strahlen wurde daher verzichtet.

3.2. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen

Nach intraperitonealer Verabreichung von Guajazulen kam es zu einem raschen Anstieg der Serumwerte, die im Schnitt bei 7 ug/ml lagen. Maximale Werte wurden zwischen der 4. und 5. Stunde nach Injektion festgestellt. 25 Stunden nach Injektion war kein Farbstoff im Blut mehr nachweisbar (Tab. 6).
Nach peroraler Verabreichung wurde ein verzögerter Anstieg der Guajazulenwerte im Blut festgestellt. Hier fanden sich im Schnitt Maximalwerte von 3 ug/ml. Diese Maximalwerte waren zwischen der 20. und 30. Stunde nach peroraler Verabreichung der Substanz festzustellen. Jenseits der 50-Stundengrenze gelang der Nachweis von Guajazulen im Blut nicht mehr.



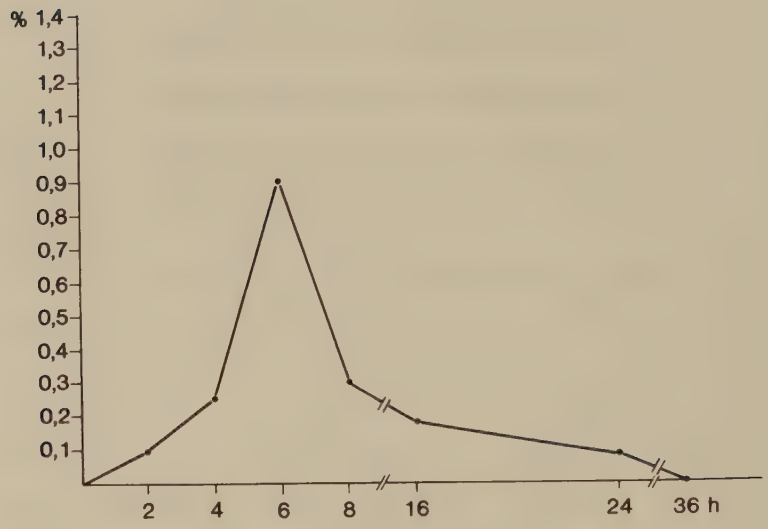
Tab. 6: Resorptionsstudien nach intraperitonealer und nach oraler Verabreichung von Guajazulen-Lipiodol bei der Ratte. a: Blutwerte nach intraperitonealer, b: nach peroraler Verabreichung.

3.3. Erfahrungen mit der technischen Durchführung der Chromolymphographie

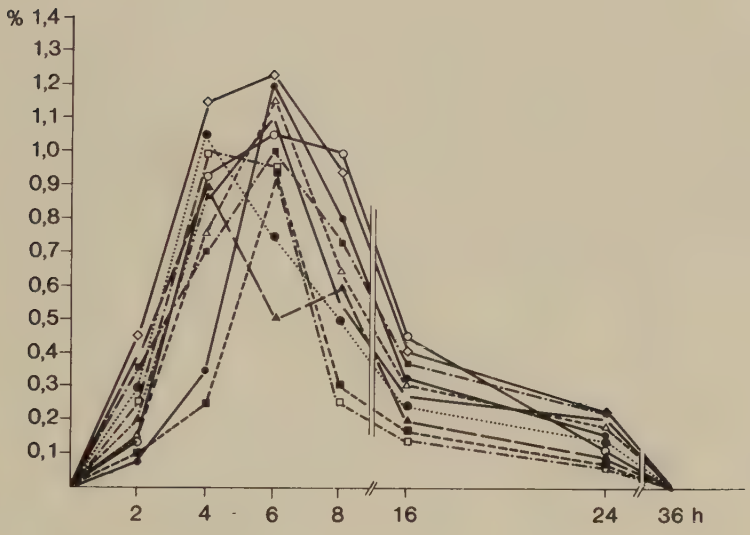
Die Fließfähigkeit der 10%igen wie der 20%igen Guajazulen-Lipiodol-Lösung entsprach der der handelsüblichen Lipiodol-zubereitung. Verstopfungen der zuleitenden Schlauchsysteme bzw. der sehr dünnlumigen Nadeln wurden nicht festgestellt. Insgesamt kann gesagt werden, daß der technische Ablauf exakt dem der herkömmlichen pedalen Lymphographie entsprach. Wundheilungsstörungen im Applikationsbereich wurden nach der Chromolymphographie nicht festgestellt.

3.4. Untersuchungen zur Resorption und Ausscheidung von Guajazulen

Die Messungen der Nullwerte, die vor Infusion der Guajazulenlösung bestimmt wurden, ergaben in keinem Fall Farbstoffnachweise, so daß festgestellt werden kann, daß das wasserlösliche Patentblau, das vor Durchführung der Chromolymphographie interdigital injiziert worden war, keine Verfälschung der Werte verursachte.
Die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) lieferte Blutwerte, die auf die infundierte Guajazulen-Gesamtmenge bezogen wurden und daher in Prozent angegeben wurden. Diese Meßeinheit wurde gewählt, um die abhängig vom Körpergewicht infundierte unterschiedliche Farbstoffmenge nicht als Quelle für Wert-Verzerrungen in den Ergebnissen wiederzufinden. Tabelle 7 zeigt anhand eines Fallbeispiels den typischen Verlauf der Guajazulen-Blutwerte bei einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden. Generell kann gesagt werden, daß zwischen der 4. und 8. Stunde nach Chromolymphographie die höchsten Guajazulenwerte im Blut gemessen wurden. Der Mittelwert der dabei beobachteten Maximalkonzentration lag bei 1,1% der applizierten Farbstoffmenge. 24 Stunden nach Farbstoffinfusion waren im Mittel lediglich 0,1 % der injizierten Farbstoffmenge im Blut festzustellen.
Tabelle 8 zeigt die Farbstoffkonzentrationen im Blut, wobei hier die Werte aller Patienten innerhalb der Zeitspanne von 24 Stunden nach Chromolymphographie kumulativ dargestellt werden.
Die mit Hilfe der gleichen Technik durchgeführte Untersuchung der zu unterschiedlichen Zeiten abgenommenen Urinproben ergab, daß Guajazulen nicht in unveränderter Form mit dem Urin ausgeschieden



Tab. 7: Typischer Kurvenverlauf der Guajazulen-Mengen im Blut zu unterschiedlichen Zeiten nach Chromolymphographie. Fallbeispiel.



Tab. 8: *Kumulative Darstellung der Farbstoffkonzentrationen im Blut, die bis zu 24 Stunden nach Chromolymphographie (10%ige Lösung) ermittelt wurden (n=10).*

wird. Da eine makroskopisch sichtbare blau-grüne Verfärbung des Urins festzustellen war, muß davon ausgegangen werden, daß farbige Metaboliten von Guajazulen mit dem Urin entleert werden. Daß die blau-grüne Verfärbung des Urins bei zunehmendem zeitlichem Abstand der Probengewinnung zur Chromolymphographie an Intensität abnahm, erscheint verständlich. Die labormäßige Erfassung und Analyse der im Urin vermuteten Metaboliten von Guajazulen wurde nicht weiter verfolgt. Da dies einen nicht unwesentlichen biochemischen Arbeitsaufwand bedeutet, wurden diese Untersuchungen für ein gesondertes Programm vorgesehen.

3.5. Ergebnisse der klinischen Kontrollen nach Chromolymphographie mit Guajazulen-Lipiodol

Im Vergleich mit der herkömmlichen Lymphographie war bei der Chromolymphographie mit Guajazulen-Lipiodol auffallend, daß die Patienten bei Beginn der Farbstoffinfusion Schmerzen zunächst in den Unterschenkeln und mit fortdauernder Infusion auch in den Oberschenkeln verspürten. Dies hatte zur Folge, daß nach zwei solchen klinischen Beobachtungen alle anderen Patienten vor Durchführung der Chromolymphographie eine Prämedikation mit Thalamonal[R1] in einer Dosierung von 0,1 mg erhielten. Entzündliche Veränderungen im Sinne von Lymphangitiden bzw. Hinweise auf allergische oder toxische Reaktionen wurden nicht festgestellt.

In zwei Fällen kam es 8 Stunden nach der Chromolymphographie zu Fieberschüben bis 39,5° C, die eine antipyretische Behandlung notwendig machten. Die Dauer dieser Fieberreaktion betrug 10 - 12 Stunden.

Die röntgenologischen Kontrollen ergaben in der Füllungsphase einen regelrechten lymphographischen Befund, der in allen Details dem der üblichen Lymphographie entsprach. Abbrüche von Lymphgefäßen infolge Verstopfung derselben durch Farbstoffagglomerate wurden nicht festgestellt.

Die Speicherphase zeigte im Einzelfall, daß gelegentlich Lymphgefäße noch kontrastmittelgefüllt sind. Dies bedeutet, daß die Chromolymphographie zu einer - allerdings gering ausgeprägten - Kontrastmittelabflußbehinderung bzw. -Stase führt (Abb.6). Somit kann eine Lymph-

[1] Janssen, Neuss

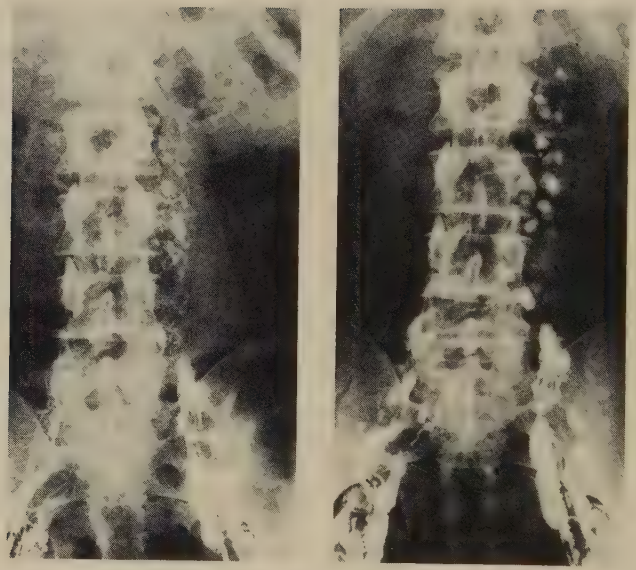


Abb. 6: Röntgenologische Kontrollen nach Chromolymphographie
a.) Füllungsphase, b.) Speicherphase

gefäßdarstellung in der Speicherphase nach Chromolymphographie nicht wie bei der herkömmlichen Lymphographie als Kriterium für einen metastatischen Befall von Lymphknoten verstanden werden.

Der Farbkontrast der retroperitonealen Lymphknoten, die im Abstromgebiet des kanülierten Lymphgefäßes liegen, war 4, 5 oder mehr Tage nach Chromolymphographie nur gering ausgebildet. Es fand sich dann ein blau-grüner Kontrast der Lymphknoten gegenüber benachbarten Gewebestrukturen. Dieser Kontrast war allerdings wenig ausgeprägt. Die Vorverlegung des Operationszeitpunktes auf den der Chromolymphographie nachfolgenden Tag führte zu einer deutlichen Verbesserung der Lymphknotendarstellung. Es wurden jetzt die Lymphknoten durch das nichteröffnete Retroperitoneum hindurch infolge der blauen Kontrastierung sichtbar. Eine Lymphgefäßanfärbung wurde einen Tag nach Chromolymphographie nicht mehr festgestellt.
Die klinischen Erfahrungen zeigten, daß das Auffinden der Lymphknoten aufgrund ihres Kontrastes wesentlich erleichtert wird. Es zeigte sich, daß dieser Kontrast eine selektive Entfernung der Lymphknoten ermöglicht, wobei die leichtere Identifizierbarkeit zu einer meßbaren Beschleunigung des operativen Eingriffes führte. Auch erschien dem jeweiligen Operateur die Resektion der so angefärbten Lymphknoten technisch einfacher als die en-bloc-Resektion nichtkontrastierter Lymphknotenketten inclusive des umgebenden Fett-Nerven-Gewebes.
Eine Beeinträchtigung der Übersichtlichkeit des Eingriffs durch bei der Resektion aus den Lymphknoten austretenden Farbstoff wurde nicht festgestellt. Abbildung 7 zeigt einen typischen intraoperativen Befund mit deutlicher Kontrastierung der paraaortal und interaortico-caval gelegenen Lymphknoten bei Lymphadenektomie wegen Hodenkarzinoms.

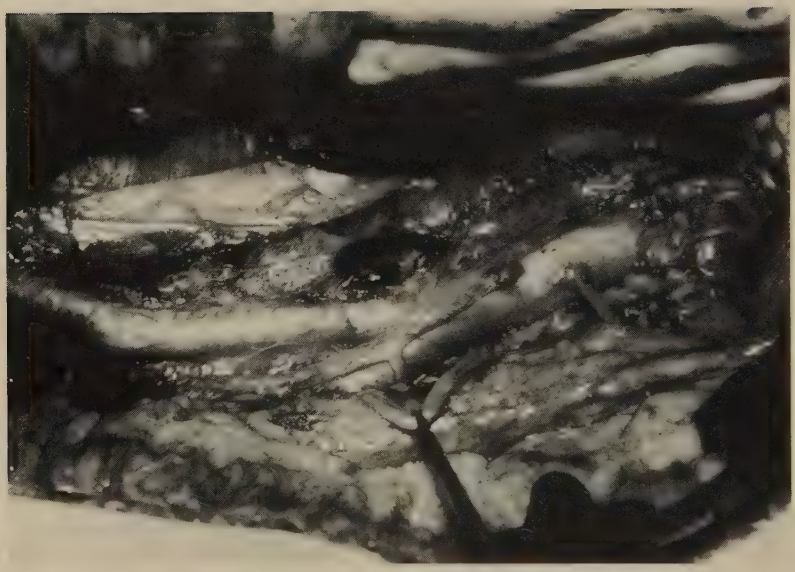
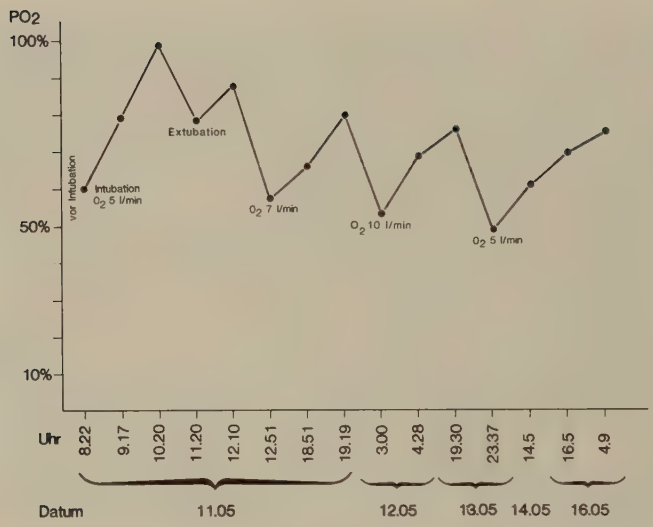


Abb. 7: *Intraoperativer Befund bei der Lymphadenektomie wegen Hodenkarzinoms. Zustand 24 Stunden nach Chromolymphographie mit Hilfe von Guajazulen-Lipiodol.*

Die klinischen Kontrollen nach Lymphadenektomie bei chromolymphographierten Patienten ergaben anhand von Blut- bzw. Serumparametern - hier insbesondere der Blutgasanalyse - und anhand von Röntgen-Thorax-Kontrollen, daß die Vorverlegung der Lymphadenektomie auf den der Chromolymphographie nachfolgenden Tag zu gewissen Problemen in der postoperativen Phase führen kann. Dies beruht auf der bekannten Tatsache, daß nach herkömmlicher Lymphographie mit Hilfe von Lipiodol^{R} pulmonale Diffusionsstörungen infolge der Fettbeladung des Lungengewebes auftreten können. Diese pulmonalen Diffusionsstörungen sind vor allem dann zu erwarten, wenn die Lymphadenektomie unter Intubationsbedingungen einen längeren Zeitraum als beispielsweise drei Stunden beansprucht. In 2 Fällen fand dies seinen Ausdruck in pathologischen Blutgasanalysen (Tab. 9) sowie in vorübergehend veränderten Befunden des Röntgen-Thorax. Abbildung 8 zeigt den Thorax-Befund 24 Stunden nach Lymphadenektomie bei einem chromolymphographierten Patienten mit Hodenkarzinom.

Die histologischen Kontrollen (Abb. 9) zeigten die vom Tierversuch her bekannten Veränderungen. Dementsprechend wurden bei herkömmlicher HE-Färbung nur noch Reste des partiell aus den Sinus ausgelösten Farbstoffes gefunden, der sich in den Sinus in büschelförmigen Kristallen zu erkennen gab. Letztlich ausschließlich auf Guajazulen zurückzuführende reaktive Veränderungen des Gewebes fanden sich nicht.



Tab.9: Extrembeispiel pathologischer PO_2-Werte nach Chromolymphographie und nachfolgender LA

Abb. 8: *Röntgen-ap-Aufnahme des Thorax 24 Stunden nach Lymphadenektomie bei einem Patienten mit embryonalem Karzinom des Hodens, der 48 Stunden zuvor chromolymphographiert worden war.*

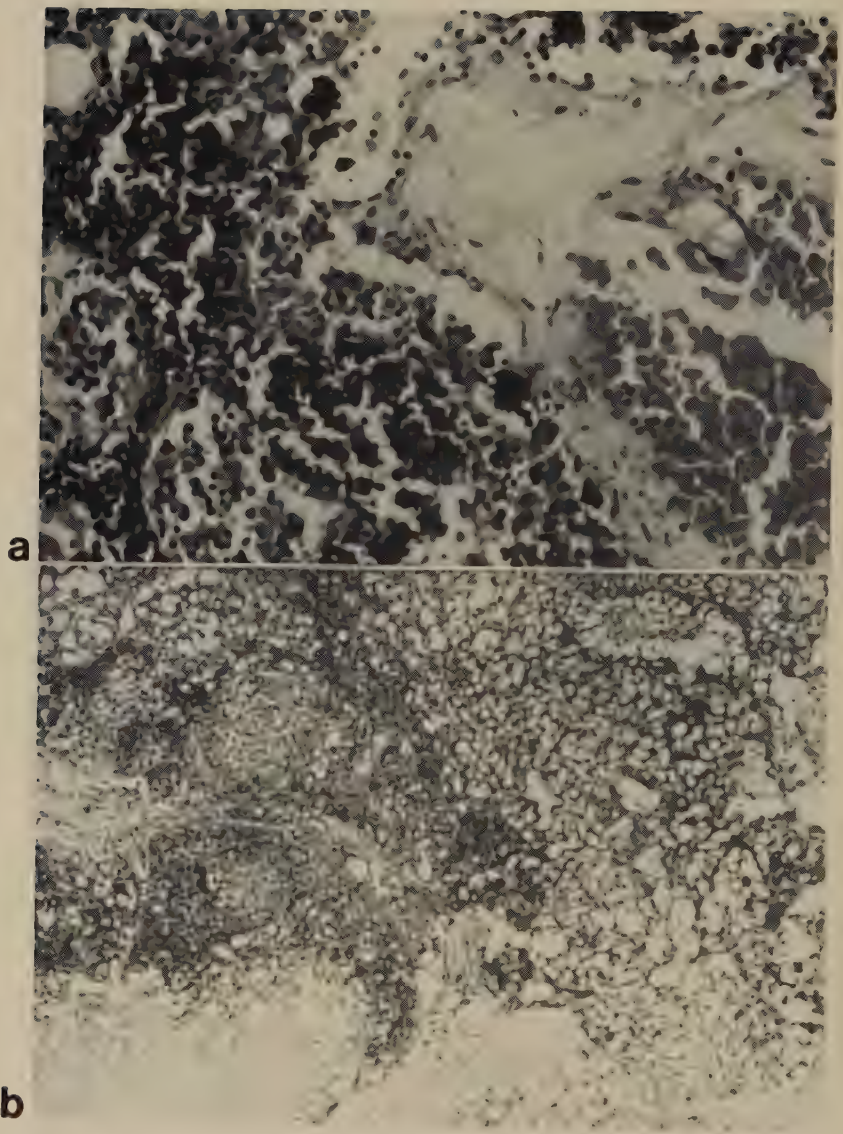


Abb. 9: Typischer histologischer Befund nach klinischer Anwendung der Chromolymphographie. a) bei herkömmlicher Fixation finden sich büschelförmige Farbstoffreste in den Sinus, b) bei Gefrierschnittechnik zeigt sich eine homogene Verfärbung der Schnitte durch Guajazulen-Lipiodol.

4. DISKUSSION

4.1. Herstellung der gebrauchsfertigen Farbstofflösung

Die mit Hilfe der Sterilfiltration hergestellten gebrauchsfertigen Lösungen zeigten abgesehen von einer 20%igen Zubereitung bei allen bakteriologischen Sterilkontrollen regelrechte Verhältnisse. Da jedoch der materielle wie zeitliche Aufwand nicht unbeträchtlich sind, ist - unter der Voraussetzung einer breiteren klinischen Anwendung - die Prüfung einer Sterilisierung der Lösung mit Hilfe von Gamma-Strahlen zu diskutieren. Neben den bakteriologischen Kontrollen sind hierzu jedoch weitergehende chemische Analysen notwendig, die der Frage nachgehen sollten, inwieweit durch die Gamma-Sterilisation Veränderungen der Lösung bzw. des Farbstoffmoleküls zu erwarten sind. Diese Untersuchungen wurden bisher hier noch nicht durchgeführt.

Zur jetzigen Situation ist zu sagen, daß mit Hilfe der Sterilfiltration die bisher benötigten Quantitäten in einem vertretbaren Zeitraum zur Verfügung gestellt werden können. Daraus geht hervor, daß für die derzeitige Situation dieses Verfahren ausreichend erscheint.

4.2. Experimentelle Daten zur Guajazulen-Resorption

Die vorgelegten Daten zeigen, daß peroral und intraperitoneal verabreichtes Guajazulen relativ rasch aus dem Blut wieder verschwindet, nachdem hier Maximalwerte des Farbstoffes 4 Stunden und 5 Stunden nach der Verabreichung festgestellt wurden. Diese rasche Farbstoffeliminierung hat den Vorteil, daß eine langfristige Farbstoffanreicherung im Körper nicht zu erwarten ist. Somit erfüllt der Farbstoff die Forderung, daß es zu keiner permanenten Verfärbung der Körperstrukturen bzw. insbesondere der Haut kommt. Nachteil der raschen Metabolisierung der Substanz ist jedoch die daraus ablesbare kurze Haftung des Farbstoffes im Gewebe, was eine Kontrastierung der Lymphknoten für nur einen kurzen Zeitraum nach der Chromolymphographie erwarten läßt. Dies würde für die klinische Anwendung die Notwendigkeit auftreten lassen, möglichst rasch nach der Farbstoffapplikation die LA durchzuführen, um dann einen bestmöglichen Kontrast der Lymphknoten gegenüber dem umgebenden Gewebe zu haben.

4.3. Technische Details der Chromolymphographie-Anwendung

Für die zu diagnostischen Zwecken eingesetzte Lymphographie ist es notwendig, Aufnahmen direkt nach Einlaufen des Röntgenkontraststoffes (Füllungsphase) und solche 24 Stunden danach (Speicherphase) anzufertigen. Hierbei werden routinemäßig neben ap-Aufnahmen auch Schrägaufnahmen durchgeführt, um eine freie Erkennbarkeit der Lymphknotengruppen vor der Wirbelsäule zu erreichen. Da die Aussagekraft der diagnostischen Lymphographie ohnehin eingeschränkt ist und Tumormetastasen erst durch größere Kontrastmittelaussparungen erkannt werden können, bleibt zu fragen, ob unter den besonderen Bedingungen der Chromolymphographie die Röntgenkontrollen nicht auf lediglich zwei Aufnahmen beschränkt werden können. Erwähnenswert ist auch, daß die Lymphographie einen doch erheblichen zeitlichen Aufwand bedeutet, der zusammen mit der diagnostischen Aussage in keinem Verhältnis steht zu den Möglichkeiten des Computertomogramms bzw. der NMR-Diagnostik. Da sich darüber hinaus klinisch die Notwendigkeit abzeichnete, wegen nur kurzer Farbstoffhaftung den Operationstermin auf den Tag nach der Chromolymphographie zu legen, ergibt sich allein daraus schon die Notwendigkeit, auf die Aufnahmen der Speicherphase zu verzichten. Zu fragen bleibt letzten Endes, ob nicht die Infusion des Farbstoffes allein ohne Fett-Träger sinnvoller erscheint, da die Möglichkeiten der röntgenologischen Kontrollen eingeschränkt sind und ihr Stellenwert gering einzuschätzen ist. Entsprechende Untersuchungen wurden eingeleitet.

4.4. Klinische Daten zur Guajazulen-Resorption

Die Ergebnisse zeigen, daß nur ein kleiner Prozentsatz der verabreichten Farbstoffmenge - und dies nur für kurze Zeit - im Blut erscheint. Die restlichen Guajazulenanteile werden offensichtlich im Lymphsystem gespeichert bzw. metabolisiert, wobei die Metaboliten in dieser Arbeit bisher nicht erfaßt werden konnten. Die Tatsache, daß es lediglich zu passageren Veränderungen des Hautcolorits kam, spricht dafür, daß eine Speicherung des Farbstoffes nicht im Vordergrund steht, daß vielmehr metabolische Prozesse eine Rolle spielen dürften.

Die Verabreichung von 20%igen Guajazulen-Lipiodol-Lösungen führte zwar zu höheren Blutwerten nach Verabreichung, jedoch nicht zu einer längeren Haftung des Farbstoffs im Gewebe. Es wäre denkbar, daß man dies erzielen könnte durch Partikelvergrößerung oder durch chemische Eingriffe in die Natur von Guajazulen, wonach dann eine längere Speicherung des Farbstoffs im lymphatischen Gewebe erzielt werden könnte. Es bleibt abzuwarten, ob eine solche Bearbeitung der Substanz nicht den unerwünschten Effekt einer längerfristigen Veränderung des Hautcolorits hat. Da diese Arbeit ein Teil eines größeren Untersuchungsprojektes ist, werden diese Untersuchungen in weiteren Schritten durchgeführt werden.

4.5. Klinische Erfahrungen mit der Guajazulen-Chromolymphographie

Die von den Patienten während der Farbstoffinfusion verspürten Schmerzen in den Unterschenkeln sind von der herkömmlichen Lymphographie nicht bekannt. Somit muß angenommen werden, daß das Guajazulen Ursache dieser Beschwerden ist. Die Verabreichung einer Prämedikation vor Chromolymphographie führte zur Beseitigung dieses Beschwerdebildes. Möglicherweise bedingt Guajazulen Reaktionen am Endothel der Lymphgefäße, wie sie analog von intravenös verabreichten Narkotika für das venöse System bekannt sind. Diese Reaktionen führten jedoch nicht zu klinisch registrierbaren morphologischen Veränderungen der Lymphgefäße im Sinne von Lymphangitiden.

Die Beimengung des Farbstoffs führt zu einer gewissen Beeinträchtigung des Transports des Lipiodols, so daß in der Speicherphase gelegentlich auch noch Lymphgefäße dargestellt werden. Da eine Lymphgefäßdarstellung in der Speicherphase bei der herkömmlichen Lymphographie eines der Kriterien eines metastatischen Befalls darstellt, beeinträchtigt die Chromolymphographie in gewisser Weise den diagnostischen Aussagewert der Lymphographie. Da andererseits die nur kurzfristige Verweildauer des Farbstoffs in den Lymphknoten eine reguläre Kontrolle der diagnostischen Lymphographie schwierig macht bzw. überflüssig macht, beeinträchtigt dies den Wert der Chromolymphographie nur unwesentlich. Es ist jedoch notwendig, auf diese Nebenwirkungen der Chromolymphographie hinzuweisen, zumal frühere Publikationen zu dieser Frage noch davon ausgingen, daß eine Beeinträchtigung der diagnostischen Aussage durch die Chromolymphographie nicht gegeben ist (10).

Die intraoperative Kontrastierung der Lymphknoten war am 1. bzw. 2. Tag nach Chromolymphographie am besten, so daß zu diesem Zeitpunkt der Vorzug der Chromolymphographie - schnellere Identifizierung der lymphatischen Strukturen - am besten genutzt werden konnte. Da naturgemäß nur Lymphknoten dargestellt werden können, die lymphatisches Gewebe enthalten, andererseits komplett mit Metastasen gefüllte Lymphknoten nicht dargestellt werden, muß festgestellt werden, daß ebenso wie bei der herkömmlichen Lymphographie nur überwiegend tumorfreie Lymphknoten der Kontrastierung zugänglich sind. Dies ließ sich an zwei klinischen Beispielen bestätigen. Einen Nachteil der Chromolymphographie für die Operation bedeutet dies jedoch nicht, da metastatisch befallene Lymphknoten der Palpation, zum Teil auch dem Auge direkt zugänglich sind und somit im Gegensatz zu metastatisch nicht veränderten Lymphknoten ohne Schwierigkeiten auch ohne die Chromolymphographie entfernt werden können. In Fällen mit nur partieller Ausfüllung des Lymphknotens mit Metastasen bzw. fehlender Metastasierung zeigte sich jedoch, daß auf Grund der leichteren Identifizierbarkeit der Lymphknoten diese rascher isoliert und entfernt werden konnten, ohne daß die Nachbarstrukturen mit-tangiert wurden. Dies erscheint als ein wesentlicher Vorteil gegenüber der en-bloc-Resektion, wie sie üblicherweise bei der Lymphadenektomie durchgeführt wird, wobei dann in bis zu 80 % der Fälle Schäden am autonomen Nervensystem auftreten (24,33). Die Frage, ob die leichtere Identifizierbarkeit der Lymphknoten und ihre Trennbarkeit von nervalen Strukturen sowie von Gefäßen zu einem geringeren Blutverlust bei der Operation führt, kann nicht Stellung genommen werden. Der Blutverlust bei der Routine-Lymphadenektomie ist ohnehin gering, so daß hier wesentliche Verbesse-

rungen der Situation nicht zu erzielen sind. Festzustellen ist, daß in Fällen mit selektiver Lymphadenektomie (in 2 Fällen mit Chromolymphographie war eine radikale Lymphadenektomie wegen Metastasierung notwendig) ein Ejakulationsverlust als Folge des operativen Eingriffs nicht festzustellen war. Dies beruht natürlich auch darauf, daß bei fehlendem Metastasierungshinweis im Bereich der ersten Filterstation (Mündung der Vena spermatica links und rechts) in der Urologischen Klinik in Tübingen nur eine Staging-Lymphadenektomie vorgenommen wird.

Die technische Vereinfachung der selektiven Lymphadenektomie unter Schonung der Nachbarstrukturen führte verständlicherweise zu einer Beschleunigung des operativen Eingriffs. Generell kann gesagt werden, daß der erhebliche Zeitaufwand bei einer retroperitonealen Lymphadenektomie für den Patienten Quelle postoperativer Komplikationen werden kann. Man kann davon ausgehen, daß eine radikale Lymphadenektomie unter Voraussetzung einer subtilen Technik 5 Stunden und mehr dauern kann. Daraus wird verständlich, daß allein von der Dauer der Narkose her postoperativ Schwierigkeiten zu erwarten sind, wenn es sich auch bei den Patienten um durchwegs jüngere Männer handelt. Für die Operation selber unter Chromolymphographiebedingungen kann gesagt werden, daß einmal die Abgrenzung gegenüber nichtlymphatischen Geweben wesentlich erleichtert wird und daß zum anderen gerade dadurch der Resektionsvorgang selber nicht nur technisch vereinfacht, sondern gleichzeitig erheblich beschleunigt werden kann. All dies bedeutet für den Eingriff selbst und somit letztlich für den Patienten Vorteile.

Als Nachteil ist für die bisherige Technik der Chromolymphographie

zu erwähnen, daß die notwendige Vorverlegung der Operation auf den Tag nach der Chromolymphographie Probleme in der O_2-Diffusion auslösen kann. Gerade weil die Lymphadenektomie eine im Schnitt 5-stündige Narkose erforderlich macht unter Intubationsbedingungen, war es bisher klinische Routine, daß nach einer Lymphographie frühestens nach 5 Tagen operiert werden kann. Hier bedarf es Verbesserungen in der Farbstoffhaftung im lymphatischen Gewebe, die dann ermöglichen würde, die Operation von der Chromolymphographie zeitlich stärker zu trennen. Ein weiterer Nachteil der Chromolymphographie ist der, daß im Einzelfall eine fieberhafte Reaktion nach Chromolymphographie auftreten kann. Auskünfte, die seitens der Kollegen der Radiologie der Universität Tübingen hinsichtlich der normalen Lymphographie eingeholt wurden, gehen dahin, daß nach der herkömmlichen Lymphographie durchaus häufig Fieberreaktionen auftreten. Somit kann eine fieberhafte Reaktion nach Chromolymphographie nicht ausschließlich auf Guajazulen zurückgeführt werden. Da diese Fieberreaktionen bei 3 von 10 Fällen nach Chromolymphographie auftrat, ist jedoch ein gewisser kausaler Zusammenhang nicht von der Hand zu weisen. Es bleibt zu überlegen, ob die flankierende Verabreichung von Anitpyretica bzw. Antiphlogistika nicht eine Verbesserung dieser Situation erzielen kann.

Für die Verwendung der 20%igen Lösung kann gesagt werden, daß der Farbkontrast intraoperativ wesentlich deutlicher war. Dies könnte eine Verlängerung des Intervalls zwischen Chromolymphographie und Operation ermöglichen. Kleine Fallzahl und damit klinisch noch nicht ausreichende Kontrollen lassen eine Aussage hierzu momentan nicht zu.

Die histologischen Kontrollen ergaben klinisch keine anderen Befunde als die, die tierexperimentell gefunden worden waren. Dies bedeutet, daß bei herkömmlicher Fixierung und Färbung Kontrastmittelreste in Büschelform bzw. Kristallform in den Sinus gefunden wurden. Demgegenüber zeigten im Einzelfall durchgeführte Gefrierschnittuntersuchungen ohne Färbung eine homogene ölige Durchfärbung des gesamten Organs. Histologische Veränderungen, die wesentlich über die nach normaler Lymphographie hinausgehen und somit zu einer Beeinträchtigung der histologischen Aussage führen, wurden nicht gefunden. Aus diesem Grunde kann festgestellt werden, daß die bisher verwandte Technik der Chromolymphographie aus Sicht der histologischen Beurteilbarkeit akzeptabel und für die Klinik anwendbar erscheint.

4.6. Verbesserungsmöglichkeiten

Wie bereits erwähnt, sollte Hauptanliegen weiterer Untersuchungen sein, durch bessere Farbstoffhaftung im Gewebe eine Verlängerung des Intervalls zwischen Chromolymphographie und Operation herbeizuführen. Dies ist grundsätzlich über chemische Eingriffe am Molekül bzw. über eine Vergrößerung der Partikelgröße denkbar. Die entscheidenden Nachteile der Chromolymphographie-wie pulmonale Diffusionsstörungen bedingt durch den frühen Zeitpunkt der Operation- dürften sich dadurch beseitigen lassen. Die im Einzelfall beobachteten fieberhaften Reaktionen nach Chromolymphographie und Schmerzen während der Chromolymphographie sollten durch entsprechende medikamentöse Maßnahmen im Sinne einer Prävention beeinflußt werden.
Ein besonders interessanter Ansatz, die jetzt vorliegende Chromolymphographie weiter zu verbessern, liegt darin, dieses Farbstoffprinzip auch für die indirekte Lymphographie anwendbar zu machen. Bei der herkömmlichen direkten Lymphographie werden verständlicherweise nur im Abstromgebiet der kanülierten Lymphgefäße liegende Lymphknoten dargestellt. Dies gilt in gleicher Weise für die Chromolymphographie. Bei verschiedenen Organmalignomen wie beispielsweise dem Harnblasenkarzinom und dem Prostatakarzinom ist es mit Hilfe der pedalen Lymphographie jedoch nicht möglich, die ersten Filterstationen (Obturatoriusgruppe) darzustellen, da diese von den pedalen Lymphgefäßen her nicht versorgt werden. Hier bietet sich die Technik der indirekten Lymphographie an, die allgemein klinisch noch nicht ausreichend ausgereift ist (9). Hierbei handelt es sich um

die Kontrastdarstellung des Organs selber, von wo dann das betreffende Kontrastmittel über die Lymphgefäße direkt in die erste Lymphknotenfilterstation abtransportiert wird. Dies ist bisher für Röntgenkontrastmittel in unterschiedlicher Form gelöst worden (9). Diese indirekte Lymphographie hat den Vorteil, daß die aufwendige Aufsuche von Lymphgefäßen für die direkte Kanülierung entfällt und vor allem die erste Filterstation jedes Organs dargestellt werden kann.

Erste im Rahmen dieser Arbeit begonnene Untersuchungen, Guajazulen auch für die indirekte Lymphographie verwendbar zu machen, betrafen die Entwicklung verschiedener Tracer-Materialien, die nach Injektion in das betreffende Organ den Transport des Farbstoffs in die angeschlossenen Lymphgefäße bewerkstelligen. Die ersten experimentellen Daten sprechen grundsätzlich dafür, daß dieses Prinzip auch für Guajazulen durchführbar ist. Für den Fall, daß eine klinische Anwendung gelingt, würde das die Möglichkeit eröffnen, die Chromolymphographie grundsätzlich vor der Lymphadenektomie bei allen denkbaren Organmalignomen aller Fachrichtungen einzusetzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Guajazulen in Kombination mit dem herkömmlichen Röntgenkontrastmittel für die Lymphographie einen geeigneten Farbstoff für die Chromolymphographie darstellt. Für die Chromolymphographie selbst, die in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde, wurden bisher unterschiedliche Farbstoffe wie Chlorophyll, Xanthophyll, Kohlenstoff, Fluorescein u.a. angewandt. Diese Substanzen führten jedoch nicht zu einer nebenwirkungsfreien und gleichzeitig sicheren Kontrastierung der Lymphknoten.

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Guajazulen-Lipiodol in der Lage ist, nach pedaler Lymphographie das angeschlossenen Lymphsystem durch einen tiefblauen Kontrast gegenüber dem benachbarten Gewebe abzubilden. Die experimentellen Daten zeigten, daß es damit gelingt, das somit angefärbte Lymphsystem selektiv zu entfernen und damit - wie das bei der bisherigen en-bloc-Resektion von Lymphknoten nicht möglich war - Nachbarstrukturen wie Gefäße und Anteile des autonomen Nervensystems zu schonen. Gleichzeitig gelingt durch die Vitalfärbung eine Verbesserung der Radikalität der Lymphadenektomie, die bis dahin über Röntgenkontrollen, zum Teil auch mit Hilfe von Radioisotopentechniken kontrolliert wurde.

Resorptionsuntersuchungen zeigten, daß die verwandte Substanz relativ schnell aus dem Blut eliminiert wird, andererseits, daß es zu bleibenden Veränderungen des Hautcolorits als Folge der Farbstoffanwendung nicht kommt. Die aus diesem Grunde erfolgte Einführung in die Klinik ergab, daß die tierexperimentell gefundenen Daten hinsichtlich des makroskopischen

Befundes denen der Klinik entsprechen. Dies bedeutet, daß die verwandte Guajazulen-Lipiodol-Chromolymphographie geeignet ist, die klinisch durchgeführte Lymphadenektomie hinsichtlich Selektivität und Radikalität zu verbessern. Gleichzeitig wurde der Effekt erzielt, den Eingriff mit Hilfe dieses Vitalfärbeverfahrens technisch zu vereinfachen und dadurch gleichzeitig zu beschleunigen. Verbesserung der Selektivität und Beschleunigung des Eingriffes sind Faktoren, die dem Patienten direkt zugute kommen.

Als nachteilig erwies sich bei der bisher durchgeführten Technik der Chromolymphographie die Tatsache, daß der operative Eingriff wegen der dann optimalen Kontrastdarstellung der Lymphknoten bereits einen Tag nach Chromolymphographie erfolgen muß. Dies hat im Einzelfall zur Folge, daß es zu passageren O_2-Diffusionsstörungen in der Lunge kommt. Da im Einzelfall auch fieberhafte Reaktionen nach Chromolymphographie auftraten, daneben auch Schmerzen während der Chromolymphographie, bedarf es weiterer Bemühungen, dieses Verfahren für die breite klinische Anwendung noch zu verbessern.

Erweiterte Anwendungsmöglichkeiten der Chromolymphographie zeichnen sich dadurch ab, daß derzeit Bemühungen unternommen werden, den Farbstoff auch für die indirekte Lymphographie nutzbar zu machen. Diese Technik verwendet eine direkte Kontrastierung des karzinombefallenen Organs, um mit Hilfe dieser Technik die davon ausgehenden Lymphbahnen darzustellen, was eine wesentliche Erleichterung des diagnostischen und therapeutischen Vorgehens erleichtern würde.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Abel, U.:
Hydroxyfunktionalisierung von Guajazulen zur Darstellung eines neuen Farbstoffes für die Chromolymphographie.
Diplomarbeit, Tübingen 1981

2. Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki:
Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test.
Mutat. Res. 31 : 347-364 (1975)

3. Chiappa, S., C. Uslenghi, G. Bonadonna, P. Morano, G. Ravasi:
Combined testicular and foot lymphangiography in testicular carcinomas.
Surg. Gynec. Obstet. 123 : 10-16 (1966)

4. Cicholska, A., L. Bolt, J. Meyer:
Microscopic Evaluation of Lymphonodular Reaction to Dye Preparations used in Chromolymphography.
Ginekol. Pol. 47 : 403-411 (1976)

5. Davidson, J.W., E.A. Clarke, D. Walker:
Radiographic appearences in Chromolymphography.
J. Ass. Canad. Radiol. 19 : 316-320 (1967)

6. Elema, J.D., S.H. van Minden, J. Oldhoff:
Some experience with Chromolymphography.
Arch. Chir. Neerl. 19 : 291-302 (1967)

7. Gregl, A., M. Eydt, U. Krack, H.J. Fichtner:
Chromolymphographie der oberen Extremität.
Fortschr. Röntg. Nukl.med. 108 : 565-576 (1968)

8. Harzmann, R., K.-H. Bichler:
Stellenwert der Lymphographie bei Tumoren der ableitenden Harnwege und des männlichen Genitales.
Med. Klin. 72 : 183-197 (1977)

9. Harzmann, R., R. Chiari, G. Dhom, F.H. Lenhardt:
Indirekte Lymphographie der Harnblase im Tierversuch.
Urologe A 17 : 261-264 (1978)

10. Harzmann, R., G. Häfelinger, H.-V. Gärtner, F. Schweinsberg:
Chromolymphographie zur Selektivitätsverbesserung der Lymphadenektomie.
In: Nicht-seminomatöse Hodentumoren (Eds. H.J. Illiger et al.)
Karger, S., Basel-München-Paris-London-New York-Sydney 1982,
pp 88-94

11. Harzmann, R., D. Gericke, K.-H. Bichler:
Praeventive Onkologie beim Harnblasenkarzinom. Karzinogenerfassung im Urin.
Helv. Chir. Acta 49 : 409-414 (1982)

12. Harzmann, R., D. Gericke, St.H. Flüchter, K.-H. Bichler:
Möglichkeiten der Labordiagnostik zur Erfassung von Harnblasenkarzinogenen.
In: Das Harnblasenkarzinom (Eds. K.-H. Bichler, R. Harzmann).
Springer, Berlin-Heidelberg 1984, pp 25-36

13. Harzmann, R., M. Bausch, G. Häfelinger, K.-H. Bichler:
Intraoperative Lymphknotenvitalfärbung.
Verh. Dtsch. Ges. Urol. 36 (1985) (im Druck)

14. Hermanek, P.:
Voraussetzungen einer modifizierten Lymphadenektomie beim Hodentumor.
In: Nicht-seminomatöse Hodentumoren (Eds. H.J. Illiger et al.),
S. Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney 1982, pp 95-101

15. Kopacz, A., J. Giedroyć, Z. Zmarzlik:
Value of Chromolymphography in the Diagnosis and Treatment of Melanoma Metastasis to Lymphnodes.
Pol. Przegl. Chir. 49 : 305-312 (1977)

16. Kuber, W., S. Leodolter:
Radioisotopenlymphonodektomie bei malignen Hodentumoren.
Urologe A 19 : 25-31 (1980)

17. Ludvik, W.:
Vitalfärbung von Lymphknoten als Hilfsmittel der Lymphadenektomie.
Urol. int. 19 : 390-409 (1965)

18. Ludvik, W., H. Kindl:
Präoperative Vitalfärbung von Lymphknoten im Rahmen der Lymphographie.
Chir. Praxis 12 : 1-6 (1968)

19. Lüning, M., M. Wiljasalo, H. Weissleder:
Lymphographie bei malignen Tumoren.
G. Thieme, Stuttgart 1975

20. Miroshnychenko, V.P., S.A. Pisachev:
Complications associated with the technique of Chromolymphography.
Tentgenol. Radiol. 2 : 101-102 (1976)

21. Miroshnychenko, V.P., S.O. Pisachev:
Comparative characteristics of direct Lymphography and Chromolymphography in guaranteeing the extent of radical combined treatment of Cancer of the Cervix and Corpus Uteri.
Pediatr. Akush. Ginekol. 5 : 46-47 (1979)

22. Orecklin, J.R., J.J. Kaufmann, R.W. Thompson:
Fertility in patients treated for malignant testicular tumours.
J. Urol. 109 : 293-295 (1973)

23. Petrova, H.V., S.A. Pysachov:
Histomorphologic changes in the Lymphnodes following Chromolymphography in Cancer of the Uterus.
Pediatr. Akush. Ginekol. 6 : 49-51 (1975)

24. Porst, H., J.E. Altwein, R. Mayer, D. Bach:
Erektions- und Ejakulationsstörungen nach retroperitonealer Lymphadenektomie (RLA beim nicht seminomatösen Hodentumor).
Urologe A 23 : 324-328 (1984)

25. Ray, B., I. Steven, F.W. Whitmore:
Distribution of retroperitoneal lymph node metastases in testicular germinal tumors.
Cancer 33 : 340-348 (1974)

26. Remizov, A.L., V.A. Filov, B.A. Ivin, Y.A.V. Bokhman, V.V. Belogorodsky, R.M. Kuznetsova, L.F. Trifonova, N.V. Eglit, B.V. Vasiliev, A.N. Stukow:
Chromolymphotrast: A Medium for Color Lymphography.
Khim. Farm. ZH. 11 : 144-147 (1977)

27. Remizov, A.L., Y.A.V. Bokhman, B.V. Vasilev, A.N. Stukov, V.P. Tobilevich:
Chromolymphography in the Oncological Surgical Clinic.
Vestn. Khir. 120 : 40-42 (1978)

28. Rummelhardt, S.:
Lymphographie mit Lipiodol-Chlorophyll.
Z. Urol. 58 : 609-612 (1968)

29. Spelsberg, F., M. Schmidt-Mende, R. Kuss:
Experimentelle Untersuchungen zur intravitalen Anfärbung von Lymphgewebe. Chromolymphographie.
Langenbecks Arch. Chir. 322 : 835-843 (1968)

30. Schmidt, F., H.H. Froehlich:
Chromolymphographie mit einer Kohlenstoff-Lipiodol-Suspension.
Radiol. Diagn. 21 : 657-664 (1980)

31. Schmidt-Mende, M., J. Mielke, F. Eisenberger, F. Spelsberg:
Zur Verbesserung der radikalen abdominellen Lymphadenektomie bei Hodentumoren. Eignung verschiedener Farbstoffe zur Chromolymphographie.
Münch. Med. Wochenschr. 109 : 1417-1420 (1967)

32. Tavel, F.R., T.G. Osius, J.W. Parker, R.E. Goodfrien, D.J. McGonigle, M.P. Jassie, E.L. Simmons, M.J. Tobenenkin, J.W. Schulze:
Retroperitoneal Lymphnode-Dissection.
J. Urol. 89 : 241-245 (1963)

33. Weißbach, L., H.U. Bode:
Die modifizierte Lymphadenektomie zur Protektion der Ejakulation.
In: Nicht-seminomatöse Hodentumoren (Eds. H.J. Illiger et al.).
S. Karger, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney 1982, pp 133-138

34. Zerbino, D., M.M. Gelfot, C. Kolbenstved:
Chromolymphographie und Vitalfärbung von Lymphgefäßen und Lymphknoten.
In: Lymphographie bei malignen Tumoren (Eds. M. Lüning et al.).
G. Thieme, Stuttgart 1975, pp 281-284

D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr. med. R. Harzmann, bin ich für die Überlassung des Themas dankbar verbunden, ebenso für die intensive Betreuung und die gewissenhafte Durchsicht meiner Manuskripte.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Privatdozent Dr. Schweinsberg sowie dessen Mitarbeiterin Frau Irena Weißenberg für die labortechnische Hilfe am Hygieneinstitut Tübingen.

Frau Professor Dr. med. H.-V. Gärtner, Institut für Pathologie der Universität Tübingen, verdanke ich die Beurteilung der histologischen Schnitte.

Ebenso danke ich Herrn Dr. P. Heide, Universitäts - Apotheke Tübingen, für die Sterilfiltration der Guajazulenproben.

Lebenslauf

Am 14. Januar 1951 wurde ich, Michael Bausch, als Sohn des Bauingenieurs Eduard Bausch und dessen Ehefrau Marie-Therese geb. Werwie in Cochem geboren.
Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Grundschule in Cochem, wechselte dann in das altsprachliche Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Trier über. Ab 1968 besuchte ich das naturwissenschaftliche Max-von-Lane-Gymnasium in Koblenz, an dem ich im Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte. Von 1971 bis 1973 leistete ich Dienst bei der Bundeswehr. Im Oktober 1973 immatrikulierte ich mich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen zunächst für das Fach Physik, im folgenden Semester für den Studiengang Biochemie. Ab Sommersemester 1976 studierte ich Humanmedizin an der Universität Heidelberg. Dort bestand ich am 18. April 1983 das 3. Staatsexamen. Das praktische Jahr absolvierte ich an dem akademischen Lehrkrankenhaus Ludwigsburg.
Am 14. Oktober 1981 heiratete ich die Studentin Andrea Feuerbacher. Aus dieser Ehe habe ich eine Tochter namens Lisa.
Seit Oktober 1983 bin ich als Wissenschaftlicher Angestellter in der Urologischen Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen tätig.